

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET

Pokretni genetički elementi i rezistencija u bakterija

Transposable genetic elements and antibiotic
resistance in bacterias

Marina Martinić

Preddiplomski studij biologije/ undergraduate biology

Mentor: Prof.dr.sc. M.Kalafati

Zagreb, 2009.

POPIS KRATICA

HGT – Horizontalni prijenos gena (horizontal gene transfer)

IS – Insercijske sekvence

MDR – sojevi – sojevi sa višestrukom rezistencijom na antibiotike (multi drug resistance)

MRSA – Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

OE-sekvence – Invertni terminalni moduli (outside end)

PGE (TGE) – Pokretni geneti ki elementi (Transposable genetic elements)

R- plazmidi – Plazmidi koji nose gene za rezistenciju

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	ii
SADRŽAJ	iii
1 UVOD.....	1
2 VARIJABILNOST.....	3
3 POKRETNİ GENETI KI ELEMENTI.....	4
3.1 Vrste PGE	5
3.2 Prokariotski transpozoni	6
3.3 Transpozicija	7
4 EVOLUCIJA SUPERBAKTERIJA.....	11
4.1 Uloga transpozona	12
4.2 R – Plazmidi	14
4.3 Staphiloccocus aureus	15
4.4 Salmonella sp.....	17
5 SUZBIJANJE RAZVOJA I ŠIRENJA R-SOJEVA	18
6 ZAKLJU AK	19
7 LITERATURA	20
8 SAŽETAK	22
9 SUMMARY	23

1 UVOD

Da su virusne bolesti problematične, a bakterijske sve izljevite postala je gotovo dogma stoljeća u kojem živimo. Rijetki su ljudi koji znaju koliko nas bakterije još mogu iznenaditi. Na spomen riječi i HIV, većina se prolaznika naježiti od pomisli na opaku bolest koja slijedi nakon zaraze ovim virusom, ali samo mali broj zna da od infekcija uzrokovanih samo jednom vrstom rezistentnih bakterija godišnje umire više ljudi nego od AIDS-a. Posljedica je toga da su ljudi zaraženi HIVom izopćeni iz društva, dok su bolnice, koje su glavna mjesta nastanka i disperzije rezistentnih oblika bakterija još uvijek svakodnevno pretpone van svih kapaciteta. S druge strane, stvarati paniku zbog pojave 'superbakterija', bilo bi jednako krivo kao i u potpunosti ih zanemarivati. Jedini pravi način na koji se možemo učinkovito i spremno suočiti s njima je opskrbiti se potrebnim znanjem, pa onda djelovati.

Cilj mi je stoga u ovome radu bio dublje zadrijeti u problematiku bakterijske rezistencije, detaljno proučiti vrste pokretnih genetičkih elemenata koje nalazimo u bakterija, njihovu ulogu u nastanku rezistentnih oblika, i razmotriti potencijalna rješenja ovog problema. Smatram da je upravo tema ovog seminara jedna od ključnih tema kojom će se znanost u slijedećih 50-ak godina morati pozabaviti kako se ne bi obistvinile mračne slutnje znanstvenika koji je prije sedamnaest godina rekao:

**'...the post-anti-microbial era may be rapidly approaching in which infectious disease
wards housing untenable conditions will again be seen'**

Cohen 1992.

2 VARIJABILNOST

Genetska varijabilnost osnova je evolucijskih promjena. Kada bi sve jedinke u populaciji bile genetski identične, i kada bi svi njihovi potomci nasljeđivali iste osobine, evolucija ne bi bila moguća. Osim same prisutnosti genetske varijabilnosti, bitna je i brojnost mogućih i postojećih varijanti. Međutim, broj varijanti veći je mogućnost da se u danom trenutku i okolišnim uvjetima pronađe dovoljan broj favoriziranih jedinki da održe ne samo vrstu, već i genetsku varijabilnost, a time i mogućnost daljnje evolucije.

Bakterije imaju kratak životni vijek i brzu izmjenu generacija, te su stoga konstantno izložene rapidnim promjenama okoliša u kojem žive. Kada ne bi imale mogućnost brzih i uspješnih adaptacija, ne bi mogle opstati u uvjetima žestoke kompeticije s drugim prokariotskim i složenijim eukariotskim organizmima. Glavni izvor genetske varijabilnosti u bakterija su mutacije. One su haploidni organizmi, što znači da se svaka nastala promjena genetičkog materijala ispoljava ne samo u bakteriji u kojoj je nastala već i kod svih njenih potomaka. No, problem je s mutacijama što su izuzetno rijetke, a nastale promjene gotovo redovito zahvaćaju samo jedan gen. Transfer gena i pokretanje genetičkih elemenata, naprotiv, rezultiraju simultanom promjenom, zamjenom, izrezivanjem i/ili dodavanjem većeg broja gena, što u konačnici za bakteriju domaćina znači brzu i opsežniju promjenu nasljedne upute, tj. veću šansu za opstanak.

3 POKRETNİ GENETIČKI ELEMENTI

Znanstvenici su godinama mislili da je molekula DNA izuzetno stabilna, te da geni nemaju mogućnost kretanja po genomu unutar stanice. Ovu znanstvenu 'dogmu' protreslo je ranih 50-ih godina 20-og stoljeća otkriće Barbare McClintock. Njezino istraživanje različitih pigmentiranih sjemenki indijanskog kukuruza pokazalo je kako su boje koje su se pojavljivale rezultat djelovanja različitih enzima. Genetskom analizom, ustanovila je da, ako su geni za formaciju enzima odgovornog za obojenje sjemenke inaktivirani, sjemenka neće biti pigmentirana, dok će, ukoliko je enzim samo djelomično promijenjen (gen djelomično inaktivan), sjemenka biti djelomično pigmentirana.

Pomnim proučavanjem i usporedbom sjemenki, McClintock je stekla uvid u promjene koje su se događale u genima, te zaključila kako moraju postojati dijelovi DNA koji se mogu kretati unutar kromosoma, po genomu kukuruza, te uzrokovati ove nasumične inaktivacije i aktivacije gena za pigmentaciju sjemenki. Otkriće je sustavno ignorirano kao nemoguće slijedećih 20 godina, dok dokaz postojanja ovakvih PGE (pokretnih genetičkih elemenata) nije pronađen i u *Escherichia Coli*. Za svoje revolucionarno otkriće, Barbara McClintock primila je 1983. god. u dobi od 81 godine Nobelovu Nagradu iz područja medicine/fiziologije. Danas znamo da pokretni genetički elementi postoje ne samo u bakterijama i kukuruza, već i kod archaea, prokariota i eukariota.



Slika 1. Barbara McClintock, Preuzeto sa: <http://www.nature.com/nature/journal/v412/n6849/full/412768a0.html>






Slika 2. Šareno obojenje indijanskog kukuruza, preuzeto sa: <http://www.lawrencelab.org/Outreach/2006/project/maize.jpg>

3.1 Vrste PGE

U osnovi, postoje 3 glavne grupe pokretnih geneti kih elemenata. To su transpozoni , te 2 grupe retrotranspozona – oni koji nalikuju na retroviruse i oni koji ne nalikuju na njih. Retrotranspozone nalazimo uglavnom kod eukariotskih organizama, dok su DNA transpozoni specifi ni uglavnom za prokariotske organizme. Skupine se razlikuju i po na inu translokacije. Prve dvije navedene skupine npr. koriste sli ne reakcije lomljenja i ugra ivanja segmenta, no razlika je u tome što je, kod DNA-transpozona, transpozabilni element sama molekula DNA koja se prenosi i ugra uje pomo u enzima transpozaze, dok je kod retrovirusima sli nih retrotranspozona mehanizam složeniji, te se ne prenosi sama molekula DNA, ve prije prenošenja RNA polimeraza prepisuje transpozabilni segment u molekulu RNA, a nakon prijenosa reverzna transkriptaza ponovno pretvara taj RNA segment u DNA, i tek se on ugra uje na novo mjesto u genomu uz pomo transpozaze, koja se u ovom slu aju iz povijesnih razloga zove integraza. Neretrovirusni transpozoni transpozabilni segment tako er prepisuju u molekulu RNA, no mehanizam prijenosa je sasvim druga iji.

Tablica 1. Glavne 3 klase pokretnih geneti kih elemenata; preuzeto i prera eno iz: Alberts, Johnson & sur., *Molecular biology of the cell*, 4. Izdanje, str. 287.

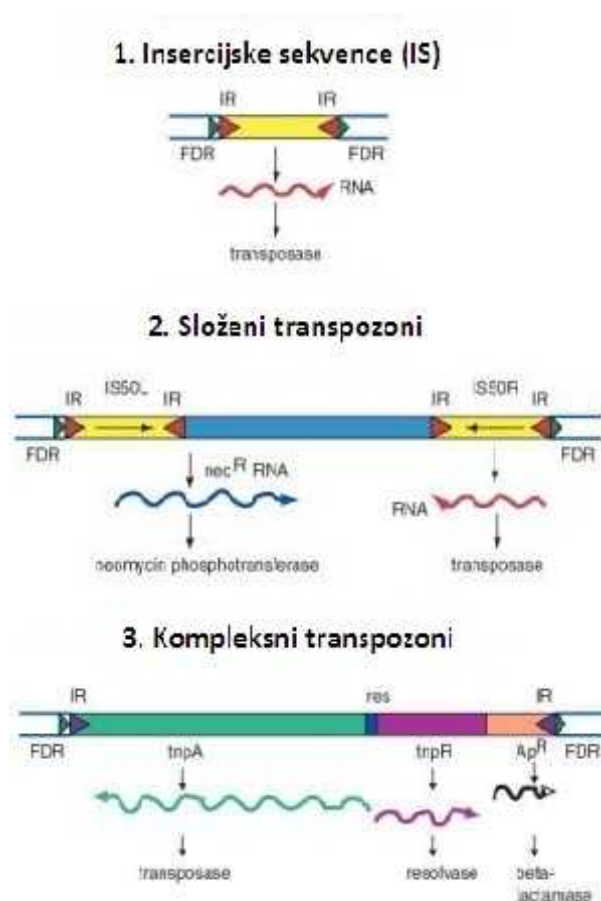
OPIS I STRUKTURA	GENI ELEMENTU	NA IN KRETANJA	PRIMJERI
DNA – Transpozoni  Kratka reverzna ponavljanja na oba kraja	Kodira transpozaze	Kreće se kao DNA, izrezivanjem ili replikacijom	P-elementi (Drosophilla) Ac-Ds mehanizam (indijanski kukuruz) Tn3 i IS1 (E.Coli)
Retrotranspozoni nalik na retroviruse  Istosmjerna duga terminalna ponavljanja na krajevima	Kodiraju reverzne transkriptaze i slične retrovirusima	Kreće se pomoću RNA intermedijera koje produciraju promotori u LTR-u	Copia (Drosophila) Ty1 (kvasac) THE-1 (čovjek) Bs1 (indijanski kukuruz)
Neretrovirusni retrotranspozoni  Ponavljanja adenina na 3' kraju RNA transkripta; 5' kraj je često skraćen	Kodiraju reverzne transkriptaze	Kreće se pomoću RNA intermedijera koje često proizvode susjedni promotori	F element (Drosophila) L1 (čovjek) Cin4 (indijanski kukuruz)
Elementi mogu biti duljine 1000 do cca. 12000 nukleotidnih parova; svaka klasa ima mnogo primjeraka od kojih su samo neki navedeni ovdje. Osim transpozabilnih (pokretnih) elemenata, postoje i određeni virusi koji			

se mogu kretati po kromosomu zaražene stanice. Ovi virusi povezani su s prve 2 navedene klase transpozona.

3.2 Prokariotski transpozoni

Kod prokariotskih organizama nalazimo prokariotske transpozone, koji su uglavnom DNA transpozoni. Mogu biti jednostavni (< 2000 pb) ili složeni od gena i ponavljaju ih sekvenci. S obzirom na nivo kompleksnosti možemo ih podijeliti u 3 osnovne skupine:

1. IS (insercijske sekvence)
2. Složeni transpozoni
3. Tn (kompleksni transpozoni; transpozoni bez terminalnih IS-a)



Slika 3. Prokariotski transpozoni. Valovite strelice pokazuju smjer transkripcije, a ispod njih su nazivi proteina koji nastaju. Preuzeto sa: http://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/TranspositionCh9_files/image024.jpg

Prvi i najjednostavniji od navedenih su takozvane insercijske sekvence ili IS elementi (Slika 3.1). Nazivamo ih velikim slovima IS nakon čega slijedi specifičan identifikacijski broj (npr. kod *E.coli* IS1, IS2). IS se uglavnom sastoji od manje od 2000 pb, a sadrže gen za enzim transpozazu obrubljen kratkim inverznim terminalnim nukleotidnim ponavljanjima-IR (inverted repeats). Ove inverzne sekvence neophodne su za proces transpozicije.

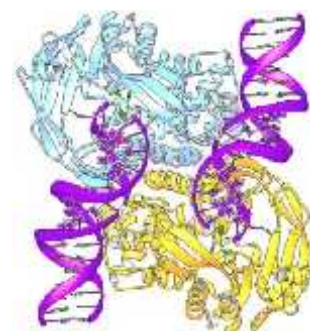
Složeni transpozoni sadrže centralnu regiju s genima, obrubljenu s 2 jednaka IS-a, koji mogu biti iste ili suprotne orijentacije (Slika 3.2). Smatra se stoga da složeni transpozoni nastaju asocijacijom dva prvobitno nezavisna insercijska elementa. Do sada provedeni pokusi pokazuju kako ovakvi transpozoni u centralnoj regiji mogu nositi bilo koju sekvencu molekule DNA.

Kompleksni transpozoni (Slika 3.3), za razliku od složenih, nemaju IS. Osim gena za transpozazu nose gene koji nisu uključeni u

sam proces transpozicije, pa tako i gene za rezistenciju na antibiotike. Ovakvi transpozoni označavaju se kraticama Tn iza kojih slijedi identifikacijski broj transpozona. Proteini koje takvi transpozoni mogu kodirati označavaju se kraticama Tnp (npr. transpozon Tn3 u centralnoj regiji sadrži gene koji kodiraju TnpA i TnpR).

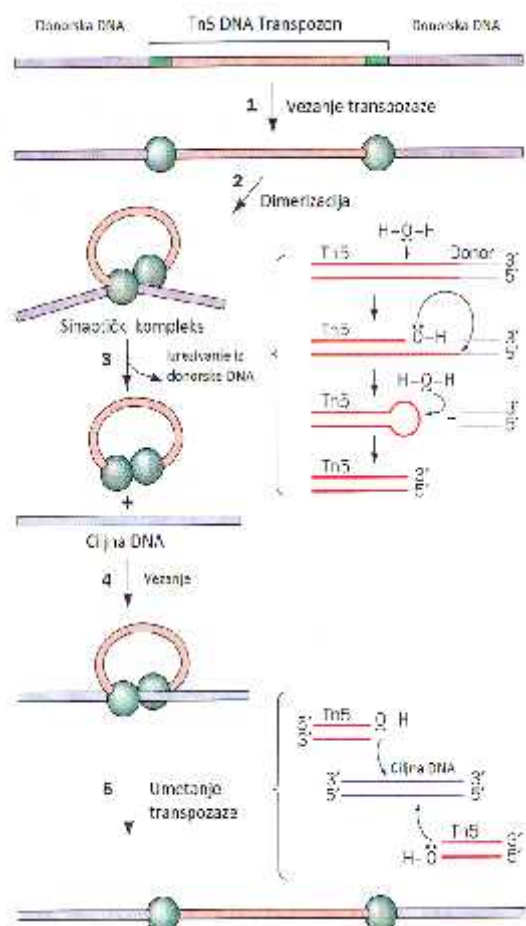
3.3 Transpozicija

Transpozicija je proces pomicanja PGE. Dva su moguća modela. Prvi je izravna ili jednostavna transpozicija, a drugi složenija replikativna transpozicija. U prvom slučaju, transpozon se izreže iz donorske DNA, i zatim seli u novu akceptorsku molekulu, dok u slučaju replikativne transpozicije, transpozon ostaje na svom originalnom mjestu, a njegova se kopija umetne na ciljno mjesto u akceptorskoj DNA molekuli.



Slika 4. Tn5 transpozaza u sinaptičkom kompleksu kod *E.coli*. Plavom i žutom bojom prikazane su podjedinice dimera transpozaze, a ljubičastom OE sekvence. Preuzeto sa: <http://www.biochem.wisc.edu/faculty/raymont/lab/gallery.aspx>

Prvi mehanizam objasniti u na primjeru Tn5 transpozona koji se sastoji od 5.8 kb, a nosi gene za Tn5 transpozazu i tri gena za rezistenciju na antibiotike. Obrubljen je invertnim modulima nalik na IS koji se zovu OE (outside end) sekvence. Tn5 premješta se direktnom transpozicijom koja funkcioniše putem cut-and-paste mehanizma koji je velikim dijelom razjasnio William Reznikoff (Reznikoff i sur. 2000). Prije same transpozicije, na svaku OE

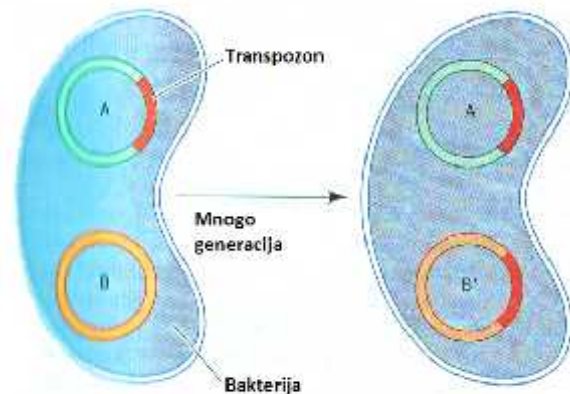
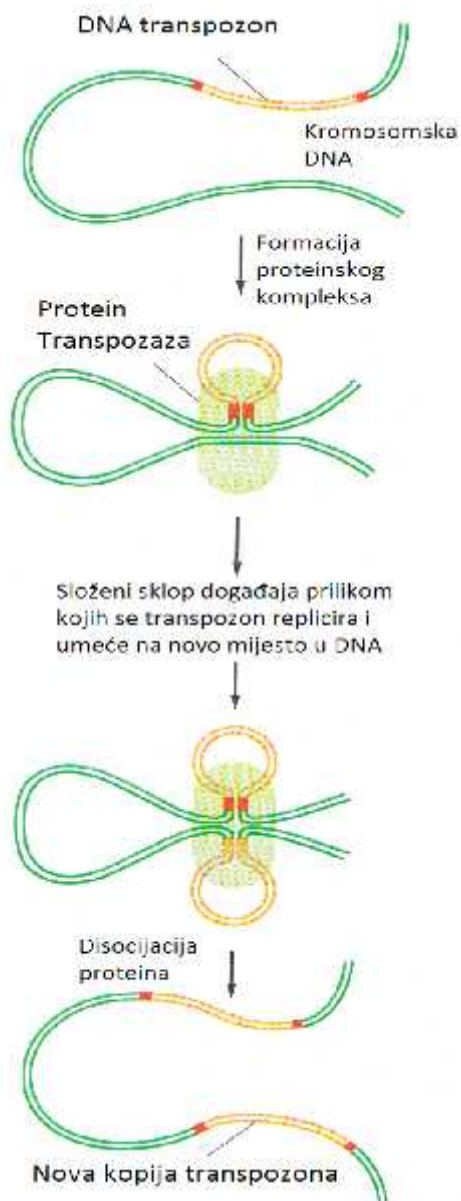


Slika 5. Izravna transpozicija Tn5 pomoću enzima transpozaze. Prema: Davies, D.R., Goryshin, I.Y., Reznikoff, W.S i Rayment, I. Science 289, 77 (2000).

sekvencu donorske DNA veže se Tn5 transpozaza (Slika 5. 1). Dvije vezane transpozaze tada se spoje, i naprave dimer (Slika 4.), koji zajedno sa transpozonom tvori katalitički aktivni sinaptički kompleks (Slika 5.2). Svaka podjedinica transpozaze tada potakne molekulu vode na nukleofilni napad vanjskog nukleotida OE sekvence, što u konačnici dovodi do oslobađanja transpozona od donorske DNA (Slika 5.3). Sinaptički kompleks tada se veže na ciljnu molekulu DNA (Slika 5.4). U posljednjem koraku, 3'-OH skupine vrše nukleofilni napad na donorsku DNA, te ulaze u transpozon na zadano mjesto (Slika 5.5).

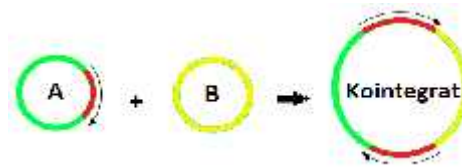
Replikativna transpozicija ima složeniji sistem transpozicije, koji još nije u potpunosti razjašnjen. Prvi korak u transpoziciji nalikuje mehanizmu kod Tn5, s tom razlikom što se samo jedan kraj transpozona 'osloba a', nakon ega slijedi složen i nerazjašnjen slijed doga aja koji uklju uju replikaciju prvobitnog transpozona, te umetanje kopije na novo

mjesto (Slika 6.). Ovaj oblik transpozicije omogu ava da nastane nekoliko kopija transpozona (koji npr. može nositi gen rezistenciju na antibiotike) unutar bakteriokromosoma, jednog plazmida, ili da se kopija transpozona prenese na drugi plazmid, a da originalni transpozon pritom



Slika 6. Osnove mehanizma replikativne transpozicije. Preuzeto iz: B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molecular biology of the cell, 4. izdanje, Garland Science, New York, 2002., str. 289.

ostane na donorskom plazmidu (slika 7.).



Slika 7. Na gornjem dijelu slike prikazana je bakterijska stanica s 2 plazmida od kojih jedan sadrži transpozon. Na donjem dijelu slike prikazana je replikativna transpozicija preko kointegrata kojeg sa injavaju 2 plazmida, transpozon i njegova kopija. Strelice označavaju smjer replikacije. Preuzeto i prerađeno iz: Donald Voet, Judith G. Voet, Biochemistry, 3. Izdanje, Wiley International Edition, 2004., str. 1197.

4 EVOLUCIJA SUPERBAKTERIJA

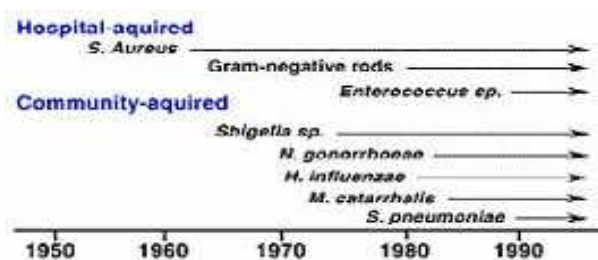
Prije ‘ere antibiotika’, izloženost ovjeka ak i danas najbezazlenijim bakterijama mogla je dovesti do ozbiljnih posljedica, a esto i do smrti. Protiv bolesti su se ljudi borili puštanjem krvi, vra anjima, amajlijama, crnom i bijelom magijom, izoliranjem oboljelih, i mnogim drugim više ili manje nefunkcionalnim metodama. Povijest je, što se bakterijskih oboljenja ti e promijenio Alexander Fleming (Slika 8.) 1929. godine otkri em antibiotika.

Tek što su se krenuli primjenjivati, antibiotici su ‘osvojili svijet’, te u kombinaciji s boljim higijenskim uvjetima spasili mnoge ljudske živote. Istovremeno, sa sve ja om i eš om primjenom, rastao je i selekcijski pritisak na bakterije. U po etku su bakterije prividno gubile bitku, no kako bi svaki antibiotik od svih postoje ih varijanti na životu ostavio samo otporne sojeve i/ili jedinke, tako bi se oni krenuli širiti, pa ak i ‘izmjenjivati’ otpornosti s drugim, nesrodnim bakterijskim vrstama. Prva zabilježena bakterija s rezistentnoš u na penicilin bila je *Escherichia coli*, 1940. godine (Abraham i Chain 1940), a od tada do danas, otpornost na razne antibiotike razvile su i mnoge druge. (Slika 9.).

Bakterijska rezistencija može biti intrinzi na (novo nastala) ili ste ena. Najjednostavniji mehanizam nastanka bakterijske rezistencije je kromosomska mutacija. Ova prvobitno nastala mutacija može se zatim prenijeti na druge bakterije horizontalnim putem tj. pomo u transformacije, transdukcije i konjugacije. Horizontalni je prijenos važan izvor genetske varijabilnosti u bakterija (Lawrence i Roth 1996; Ochman, Lawrence i Groisman 2000). Transpozoni pak mogu sudjelovat pri samom nastanku mutacija u bakterijskom kromosomu, no uglavnom igraju važniju ulogu u prenošenju gena za rezistenciju na antibiotike. Smatra se da je formacija R-faktor plazmida s višestrukim genima za rezistenciju na antibiotike vjerojatno posljedica nakupljanja upravo transpozona koji kodiraju rezistenciju na razli ite antibiotike na istom plazmidu [23]. Za razvoj ovakvih rezistentnih sojeva, tzv. superbakterija, osobito su plodna tla velike bolnice, zbog stalne i intenzivne izloženosti bakterija selekcijskom pritisku brojnih antibiotika.



Slika 8. Alexander Fleming u svom laboratoriju. Preuzeto sa <http://herbarium.usu.edu/fungi/FunFacts/Fleming.jpg>



Slika 9. Pojava nekih rezistentnih sojeva bakterija tokom povijesti u bolnicama i van njih. Preuzeto sa: <http://www.pubpol.duke.edu/courses/pps255s/2003/w-team-a/prod02.htm>

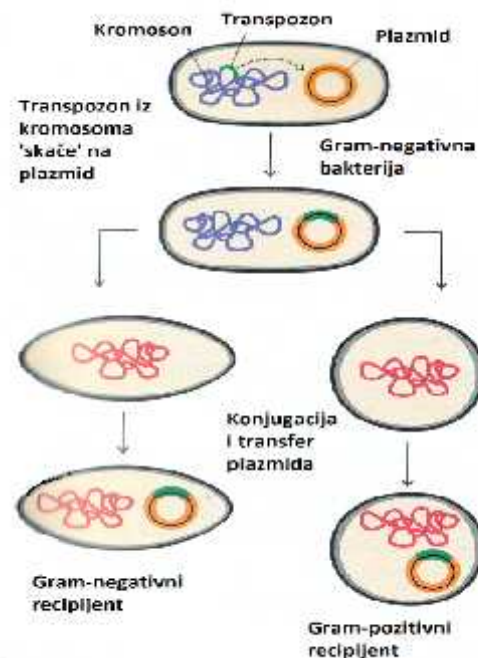
4.1 Uloga transpozona

Transpozoni uvelike povećavaju mogućnost izmjene genetskog materijala i povećanja varijabilnosti. Odgovorni su za velik dio genetske remodelacije u prokariota. Gotovo svaka genetska sekvenca (jedan gen ili više njih) obrubljena IS elementima može se premještati na različita mjesta u genomu.

Osim što sami sebe umetnu u molekulu DNA, transpozoni mogu uzrokovati inverziju, deleciju, i naravno, inserciju različitih gena, čime sudjeluju u preslagivanju domaćinove genetske upute. Mogu se premještati iz bakteriokromosoma u plazmid ili obrnuto, između 2 plazmida (Slika 10.), a ako su na plazmidu, putem njega i u druge bakterijske

jedinke. Transpozoni i plazmidi mogu potaknuti bakteriju na konjugaciju, stvaraju i tako priliku za horizontalan prijenos gena za rezistenciju. Ukoliko je plazmid samo-prijenosni (self-transmissible), transfer je moguć i između bakterija koje nisu srodne, pa tako iste gene za antimikrobnu rezistenciju možemo pronaći kod *E.coli* (Gram negativna) i *Clostridium* (Gram pozitivna) [21] (Slika 10.).

S obzirom na sve dosadašnje spoznaje, čini se da su transpozoni zaista važni u evoluciji bakterijskih kromosoma i plazmida. Za nastanak R-plazmida odgovorna je akumulacija korespondirajućih transpozona s rezistencijom na različite antibiotike na ovim plazmidima. Reorganizacije genotipa posredovane transpozonomima mogle bi biti odgovorne za premještanje i organiziranje isprva udaljenih gena u koordinirane, regulirane operone, kao i za formiranje novih proteina povezivanjem dvaju prvobitno nezavisnih segmenata gena. Štoviše, u stalnoj prisutnosti njih transpozona u nesrodnim bakterijama pruža neke indikacije da bi transfer gena posredovan transpozonomima mogao biti neovisan o srodnosti vrste, za razliku od transfera



Slika 10. Prijenos transpozona unutar iste bakterije, te u druge bakterijske organizme. Preuzeto iz: E.W. Nester, D.G. Alderson, C.E. Roberts Jr., N.N. Persall, M.T. Nester, Microbiology, a human perspective; 4. Izdanje, McGraw-Hill, New York, 2004, str. 213.

homolognom

rekombinacijom

[23].

4.2 R – Plazmidi

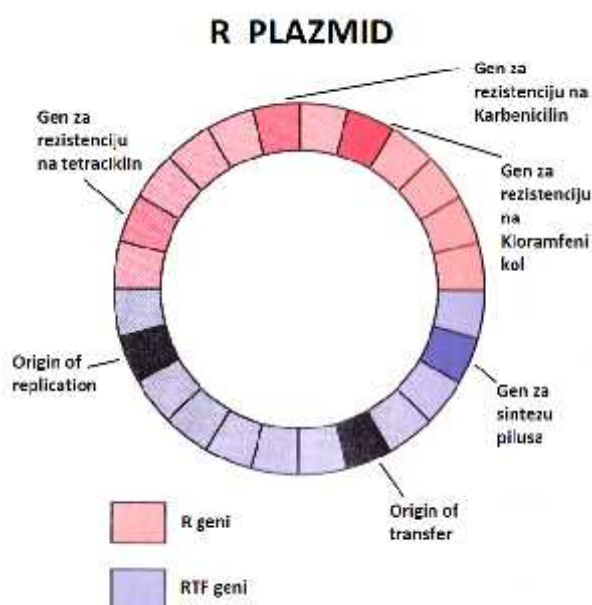
R- plazmidi su jedna od najvažnijih i najprouavanijih grupa plazmida. Slovo R u imenu potje e od rije i Resistance (otpornost, rezistencija), koja nam ve sama po sebi govori karakteristiku zbog koje su toliko bitni. Naime, R-plazmidi na sebi nose višestruke gene za rezistenciju na razne antimikrobne lijekove i teške metale (npr. arsen). Mnogi od ovih plazmida sastoje se od 2 seta gena: gena za rezistenciju (R-gena) i RTF (resistance transfer factor) gena koji u samoprijenosnom plazmidu

kodiraju za transfer plazmida konjugacijom (Slika 11.). U takvom plazmidu, RTF nosi gene za nastanak pilusa.

R geni kodiraju rezistenciju na različite antibiotike, najčešće sulfanilamid, streptomycin, kloramfenikol, tetraciklin. Mogu nositi rezistenciju na samo jednu od njih ili na sve, a mogu i na neke druge. Najvažnije je svojstvo to da se otpornost na antibiotike može prenositi s rezistentnih sojeva na nerezistentne ali i na one koji već nose rezistenciju na iste ili različite antibiotike, stvaraju i tako višestruku otpornost. R-plazmidi se mogu prenositi i u velikim brojem Gram- negativnih bakterija kao što su *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Vibrio* i *Pseudomonas*, dakle,

ukoliko bi jedna od ovih vrsta u mješovitoj populaciji posjedovala R-plazmid, on bi se mogao prenijeti na sve navedene [21].

Općenito, bakterije vrlo brzo razvijaju otpornost na gotovo sve antibiotike (Neu 1992), a rezistencija koju jedna bakterija razvije prenosi se lako na druge horizontalnim putem, tj. transdukcijom, transformacijom i konjugacijom. Najviše bakterija sa R plazmidima nalazimo u bolnicama, gdje ponekad uzrokuju tzv. bolničke ili nosokomijalne infekcije. Najčešći uzročnici ovih infekcija su bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp.*, itd. [21]. Bolničke infekcije zabilježili su još stari Grci, a u novije vrijeme pojavljuju se u 5-6% zaprimljenih pacijenata, s time da je postotak viši kod zemalja u razvoju, gdje su uvjeti i higijena lošiji,

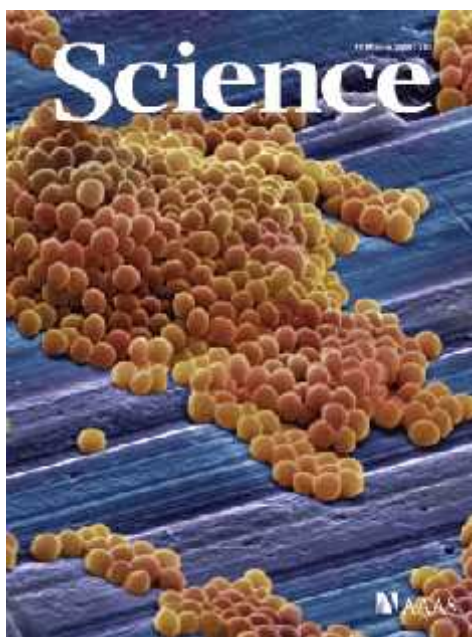


Slika 11. Regije na R plazmidu. Preuzeto iz: E.W. Nester, D.G. Alderson, C.E. Roberts Jr., N.N. Persall, M.T. Nester, Microbiology, a human perspective; 4. Izdanje, McGraw-Hill, New York, 2004, str. 210.

a antibiotici se esto neumjereno upotrebljavaju [21]. U SAD-u, 1992. godine, hospitalizacija i lije enje samo jednog slu aja rezistentnog oblika tuberkuloze, stajalo je oko \$180000 (Cohen 1992).

4.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram pozitivna bakterija koja je osobito poznata po svojoj prilagodljivosti i sposobnosti razvitka rezistencije na antibiotike. Jedna je od najvirulentnijih patogena današnjice. U svakome trenutku, 3/10 ljudi u SAD-u asimptomatski kolonizira *S.aureus* na koži i mukoznim membranama. Neki su samo



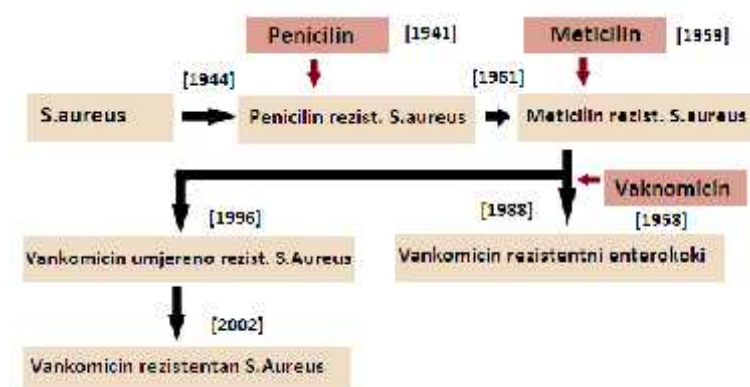
Slika 12. Scanning mikroskopska slika *S.aureus* na naslovnici asopisa science 21.03.2008. godine. Preuzeto sa: <http://www.sciencemag.org/content/vol319/issue5870/cover.dtl>

intermedijarni prenosioci dok mnogi nose kolonije duži vremenski period, ime se pove ava mogu nost razvoja infekcije ukoliko bakterije putem rane ili nekog operacijskog zahvata budu uvedene dublje u tkivo. Prije izuma antibiotika, smrtnost tako zaraženih osoba bila je ak 80%.

Alexander Fleming prvi je zabilježio djelovanje penicilina na *S.aureus*, što je dovelo do proizvodnje i distribucije tog antibiotika u enormnim koli inama, zbog ega se mortalitet ranjenih i oboljelih u 2. Svjetskom ratu s obzirom na 1. Svjetski rat znatno smanjio. Pred sami kraj 2. Svjetskog rata, to nije, 1944. godine, zabilježeni su prvi rezistentni sojevi *S.aureus* (Kirby 1944) (Slika 13.). Ti su sojevi pokazivali isti mehanizam inaktivacije enzimom

penicilnazom kao i prva zabilježena rezistentna *E.coli* (Abraham i Chain 1940). Do 1992. Godine, 95% svih poznatih sojeva *S.aureus* postalo je otporno na penicillin i njemu srodne lijekove (Neu 1992). Kako je u inkovitost penicilina protiv *S.aureus* rapidno padala, farmaceuti su sintetizirali meticilin, no do 1980-ih, i rezistencija na meticilin bila je uobi ajena u sojeva *S.aureus*, koji su, tako er, pokazivali i prije navedenu rezistenciju na penicillin. Sredinom 1980-ih otkriveni su florokinoli, koji su ve pri niskim koncentracijama ubijali *S.aureus* i lije ili ozbiljne infekcije. U po etku se smatralo kako je problem sa *S.aureus* riješen, no ve tokom 1990. godine, u jednoj

bolnici u New Yorku, otpornost na florokinole rapidno je skočila s 5% na 80% i proširila se po cijelom svijetu [22].



Slika 13. Evolucija nekih rezistentnih oblika *S. aureus*. Preuzeto i prerađeno iz: JiYeon Kim, Understanding the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Clinical Microbiology Newsletter 31:3 (2009), str. 17.

U posljednje vrijeme, ova je bakterija izuzetno ‘popularna’ (Slika 12.) među znanstvenicima zbog lakoće kojom stječe otpornost na različite lijekove, a osobito je dobro proučavan MRSA (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*). Mehanizmi njegove evolucije proučavaju se već 20 godina. U početku se smatralo da su svi sojevi MRSA potekli od jedne linije klonova (single-clone model) (Kreiwirth i sur. 1993.), no napredne molekularne metode pokazale su da je veća vjerojatnost da je do transfera gena za rezistenciju došlo više od jednom (Musser i Kapur 1992., Enright i sur. 2002.). Rezistencija na meticilin zabilježena je danas u 60-70% svih svjetskih izolata *S. aureus*. Procjene centra za kontrolu i prevenciju bolesti ukazuju kako je u SAD-u svake godine 100 000 ljudskih života u opasnosti samo zbog infekcije MRSA, a otprilike 19 000 ljudi umire od istog uzroka, što je veći broj umrlih nego od HIV-a/AIDS-a (Klevens i sur. 2007).

Do danas, zbog jake selekcije, transpozicije i integracije gena za rezistenciju u kromosom *S. aureus*, neki su sojevi postali otporni na veliki broj antibiotika, uključujući: eritromicin, tetraciklin, minociklin, streptomycin, sulfonamide, (Slika 13.) itd... pa čak i na neke teške metale, kao što su kadmij i bakar.

4.4 *Salmonella* sp.

Rod *Salmonella* predstavljaju razli ite vrste gram-negativnih fekalnih koliforma. (Slika 14.) Cijeli rod spada u svojtu Enterobacteriaceae, gdje izme u ostalog spada i *E.coli*. Nalazimo ih u probavnom traktu toplokrvnih i hladnokrvnih životinja (uklju uju i i ovjeka). Neke su vrste prisutne u širokom spektru domadara, dok su neke usko specijalizirane samo za odre ene. Uzrokuju dvije vrste bolesti: enteri ku (tifoidnu) groznicu do koje dolazi kada bakterijske stanice dospiju u krvotok, te akutni gastroenteritis (salmonelu) koji nastaje ukoliko do e do unosa bakterije/toksina putem hrane.



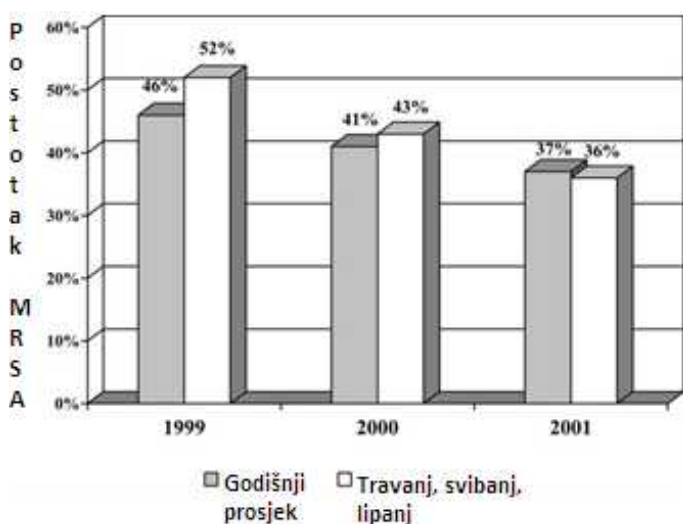
Slika 14. *Salmonela* na hranjivoj podlozi. Preuzeto sa: <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Salmonella.html>

Pojavljivanje sojeva ovog roda s višestrukom rezistencijom na razli ite lijekove – MDR (multi drug resistance), sve više zabrinjava. Znanstveni podaci pokazuju da je u estalost rezistentnih sojeva *Salmonella* porasla sa 20-30% koliko je iznosila ranih 90-ih godina 20. stolje a na ak 70% (u nekim zemljama) prijelaskom stolje a (Su, Chiu, Chu i Ou 2004.).

Neke vrste roda *Salmonella*, npr. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium DT104 koja pokazuje rezistenciju na razli ite antibiotika, izme u ostalog, ampicilin, kloramfenikol, streptomycin, sulfametoxazol i tetraciklin, uzrokovala je infekcije od kojih su umirali ljudi i životinje diljem svijeta (Body i sur. 2001., Cody i sur. 1999., Grein i sur. 2001.). Mobilni geneti ki elementi, transpozoni, plazmidi i bakteriofagi, velikim su dijelom odgovorni za HGT (horizontalni transfer gena) me u razli itim sojevima, a tokom HGT-a, geni za za rezistenciju *Salmonella* mogu se prenijeti s jednog soja na drugi (Zhao i sur. 2003., Doublet i sur. 2003.).

5 SUZBIJANJE RAZVOJA I ŠIRENJA R-SOJEVA

Novi oblici rezistentnih sojeva bakterija svih vrsta neprestano nastaju, te je stoga neophodno stalno smišljati nove oblike borbe protiv njih. Današnje se metode uglavnom svode na sprječavanje širenja R-sojeva: dezinfekciju i kontrolu mjesta na kojima najčešće nastaju (uglavnom bolnica). U Le centre hospitalier de Pontoise bolnici u Francuskoj, uvedena je 1998. godine izolacija pacijenata koloniziranih ili inficiranih multirezistentnim sojevima bakterija. Od 1999. godine, ova je metoda urodila smanjenjem postotka MRSA sa prosječnih 46% na 37% godišnje. (Martres, Tibault i Lémann, 2003.) (Slika 15.). Druga je



Slika 15. Postotak MRSA sojeva među svim izoliranim sojevima iz Le centre hospitalier de Pontoise u francuskoj tokom godina. Preuzeto iz: P. Martres, M. Thibault, F. Lémann 2003. Significant decrease of rate and incidence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a French general hospital between 1999 and 2001, Pathologie Biologie 51: 474–478.

metoda neprestano uvođenje novih vrsta antibiotika. Antibiotici mogu napadati do sada netaknute vijabilne strukture bakterija, ili imati jači učinak. Zabrinjavaju je podatak da su u zadnjih 40 godina izumljene samo dvije nove klase antimikrobnih agensa [21].

Na sreću, intenzivan procvat molekularne biologije u posljednjih 15-ak godina, te znanosti kao što su genomika i bioinformatika, daju nam nadu da će borba protiv bakterijskih bolesti, i njihove rezistencije u skorijoj budućnosti doživjeti revoluciju. Naime, nove se strategije temelje na poznavanju bakterijskih genoma, i intenzivno se radi na njihovom kartiranju. Velike internetske baze podataka pune se svaki dan novim informacijama, te se stvaraju velike banke gena u kojima su između ostalog, nasljedne upute velikog broja ljudskih patogena.

Potencijalne su mete u uništavanju R-sojeva geni koji su zaslužni za virulentnost, a istovremeno se ne nalaze u nasljednoj uputi domaćina (bilo ljudi ili životinja). Jedan je od sada predloženih načina njihove inaktivacije proizvodnja proteinskih inhibitora, no za to je potrebno prethodno poznavanje gena koji kodiraju za određene enzime, strukture samog enzima, te njegove regulacije.

6 ZAKLJUČAK

Pri temperaturi ljudskog tijela, bakterije imaju generacijsko vrijeme od cca. sat vremena, pa u relativno kratkom vremenu stvaraju iznimno velik broj jedinki. Nakon izuma antibiotika, ti su isti bakterijski organizmi podvrgnuti snažnom selekcijskom pritisku. Što se više antibiotika upotrebljava, to je brža evolucija rezistentnih oblika bakterija. Pokretni geneti ki elementi još više kompliciraju situaciju, s obzirom na to da mogu uzrokovati otpornost bakterije na antimikrobne agense, ali i prenijeti tu otpornost na nesrodne vrste, pa tako dodatno ubrzati evolucijske procese. Izme u bakterija i farmaceutske industrije vodi se stoga neprestana bitka koja uvelike podsje a na koevoluciju predatora i njegova plijena.

Na pojavu i širenje rezistentnih oblika bakterija utje u uglavnom složeni i kompleksni transpozoni. Insercijske sekvence ne mogu nositi R-gene, no mogu imati stanoviti utjecaj ukoliko se transpozicijom umetnu unutar sekvence odre enog gena, te ga svojom prisutnoš u inaktiviraju. Tako er, replikativna transpozicija ima ve i u inak, zato što umnožava set gena koji se nalazi u sklopu transpozona, dok se izravnom transpozicijom transpozoni i svi geni koje sadrži samo premještaju s jednog mjesta na drugo. Replikativna transpozicija tako može biti odgovorna za nastanak npr. višestruke otpornosti na antibiotike unutar jedne bakterije, ili prenijeti kopiju gena za rezistenciju u drugu bakteriju/bakterijsku vrstu. Nakupljanje transpozona koji nose različite gene za transpoziciju na istom plazmidu, te reorganizacije genetske upute posredovane transpozonomima jedan su od uzroka nastanka R-plazmida.

Današnje metode borbe protiv rezistentnih oblika bakterija svode se uglavnom na sprječavanje njihova širenja, te otklanjanje posljedica, što, ako se uspješno provodi pokazuje rezultate u vidu manjeg broja oboljelih i ve e stope preživljavanja, no da bi problem zaista otklonili, moramo se pozabaviti njegovim uzrokom. Istraživanja bakterijskih genoma koja se provode posljednjih nekoliko godina pokazuju obilježja rezultate, i sve je više patogena ije su genetske sekvence dekodirane. Slijede i je korak potpuno razumijevanje njihove genetske upute i evolucijskih procesa kojima nastaju. Tek tada mogu e je odrediti gene koji bi mogli biti potencijalne mete za inaktivaciju patogenosti. U ovome pogledu, smatram da transpozoni imaju veliku perspektivu, jer, kao što je ranije napomenuto, osim što mogu premještati gene, mogu ih inaktivirati ukoliko se umetnu na takvo mjesto unutar gena da sprječavaju daljnju transkripciju. Moje je mišljenje da bi se zato u slijede ih dvadesetak godina trebalo pozabaviti detaljnim istraživanjima mehanizama transpozicije i receptorskih mjesta u genomu na koja se ume u ili prepisuju transpozoni.

7 LITERATURA

- [1]. Abraham, E.P. and E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**:837-842.
- [2]. Boyd DA, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, et al. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol* **183**:5725–32.
- [3]. Cody SH, Abbott SL, Marfin AA, Schulz B, Wagner P, Robbins K, et al. 1999. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *JAMA* **281**:1805–10.
- [4]. Cohen M.L. 1992. Epidemiology of drug resistance, implications for a post-microbial era. *Science* **257**:1050-1055.
- [5]. Davies, D.R., Goryshin, I.Y., Reznikoff, W.S., and Rayment, I. 2000. *Science* **289**:77
- [6]. Doublet B, Lailier R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, Mulvey MR, et al. 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerg Infect Dis* **9**:585–91.
- [7]. Enright, M. et al. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7687-7692.
- [8]. Grein T, O’Flanagan D, McCarthy T, Bauer D. 1999. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium food poisoning at a wedding reception. *Ir Med J* **92**:238
- [9]. JiYeon Kim, 2009. Understanding the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology Newsletter* **31**:3
- [10]. Kirby, W. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science* **99**:452-453.
- [11]. Klevens, R.M. et al. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* **298**:1763-1771.
- [12]. Kreiswirth, B. et al. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**:227-230.
- [13]. Lawrence JG, Roth JR. 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**:1843–60.

- [14]. P. Martres, M. Thibault, F. Lémann 2003. Significant decrease of rate and incidence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a French general hospital between 1999 and 2001, *Pathologie Biologie* **51**: 474–478.
- [15]. Musser, J. and V. Kapur. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2058-2063.
- [16]. Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance science **257**:1064-73
- [17]. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299–304.
- [18]. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis* **39**:546–51.
- [19]. Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SL, White DG, et al. 2003. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. *J Clin Microbiol* **41**:5366–71.
- [20]. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular biology of the cell*, 4. Izdanje, Garland Science, New York, 2002.,
- [21]. E.W. Nester, D.G. Alderson, C.E. Roberts Jr., N.N. Persall, M.T. Nester, *Microbiology, a human perspective*; 4. Izdanje, McGraw-Hill, New York, 2004.
- [22]. Stephen C.Stearns, Rolf F. Hoekstra, *Evolution an introduction*, 2. Izdanje, Oxford University Press Inc., New York, 2005.
- [23]. Donald Voet, Judith G. Voet, *Biochemistry*, 3. Izdanje, Wiley International Edition, 2004; 1194-1200.
- [24]. <http://www.biochem.wisc.edu/faculty/rayment/lab/gallery.aspx>, Ivan Rayment lab at biochemistry, 21.02.2008; 05.05.2009.
- [25]. <http://www.lawrencelab.org/Outreach/2006/project/maize.jpg>, Plant Genome Outreach to Native Americans, Titus Harrison i Sharon Garfield; 05.05.2009.
- [26]. <http://www.pubpol.duke.edu/courses/pps255s/2003/w-team-a/prod02.htm>
- [27]. <http://www.nature.com/nature/journal/v412/n6849/full/412768a0.html>; 30.04.2009.
- [28]. <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Salmonella.html>, The Microbial World, University of Wisconsin – Madison, *Salmonella* and salmonellosis,   2005 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology; 21.05.2009.

Varijabilnost je osnova evolucijskih promjena. Mutacije su osnova za nastanak varijabilnosti prokariota, no vrlo su rijetke, i jedna mutacija rezultira uglavnom promjenom jednog gena, te su stoga horizontalni prijenos gena i pokretni geneti ki elementi glavni imbenici u evoluciji bakterijskih organizama. Cilj mi je stoga u ovome radu bio detaljno prou it i vrste pokretnih geneti kih elemenata koje nalazimo u bakterija, njihovu ulogu u nastanku rezistentnih oblika, te razmotriti potencijalna rješenja ovog problema. Razlikujemo tri vrste PGE: transpozone i dvije vrste retrotranspozona. Kod prokariotskih organizama nalazimo DNA transpozone koje s obzirom na složenost opet dijelimo u tri skupine: Insercijske sekvence (IS), složeni transpozoni i kompleksni transpozoni (transpozoni bez terminalnih IS-a). Insercijske sekvence nose samo gen a transpozazu, dok složeni i kompleksni transpozoni mogu nositi više gena, pa tako i gene za bakterijsku rezistenciju. Transpozicija je mogu a na dva na ina: (1) izravnim izrezivanjem i premještanjem na novo mjesto u genomu i (2) složenim replikativnim procesima prilikom kojih prvobitni transpozon ostaje na svome mjestu, a kopija se ume e na novo. Transpozoni se stoga mogu premješati s bakterijskog kromosoma na plazmid, s plazmida na bakteriokromosom i izme u plazmida, te pritom uzrokovati inverziju inserciju i deleciju ili napraviti višestruke kopije gena, što se danas smatra da je jedan od uzroka tj. na ina nastanka R-plazmida. Da bi se u budu nosti mogli nositi s izazovima novih vrsta bakterijske rezistencije, nužno je dobro razumjeti i dalje prou avati mehanizme njihova nastanka, te funkciju svakog pojedinog gena uklju enog u evoluciju R-oblika.

Klju ne rije i: Varijabilnost, pokretni geneti ki elementi (PGE), transpozoni, Insercijske sekvence (IS), rezistencija, transpozicija, R-plazmid.

9

SUMMARY

Variability is the key of evolutionary changes. Mutation is a basic source of variation within prokaryotic species, but mutations are rare, and usually only a single gene changes at one time, so horizontal gene transfer and transposable genetic elements (TGE, jumping genes) are the main factors in evolution of bacterial organisms. My goal was to study all the types of TGE in bacterial organisms, determine their role in creation of resistant forms, and discuss potential solutions for this problem. We can identify three sorts of TGE: transposons and two sorts of retrotransposons. In prokaryotic organisms, only DNA transposons appear, and we can again, considering their complexity, divide them into three main groups: Insertion sequences (IS), composite transposons and complex transposons. Insertion sequences carry only genes that code for protein transposase, while combined and complex transposons carry multiple genes, for instance: antimicrobial resistance genes. There are two modes of transposition: (1) direct transposition by cut-and-paste mechanism and (2) replicative transposition in which the original transposon remains in its site, and a copy is inserted at a target site. Thus, transposons can move from bacterial chromosome to plasmid (and vice versa), between plasmids, and during that, cause inversion, insertion and deletion, or create multiple copies of genes, which is today considered to be the cause for R-plasmid creation. In order to deal with challenges of new antimicrobial resistances, we must fully understand and continue to research mechanisms of their appearance, and function of every gene included in the evolution of R-forms.

Key words: Variability, transposable genetic elements (TGE), transposons, insertion sequences (IS), resistance, transposition, R-plasmid.